

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/87, 15/11, C07K 14/00, A61K 48/00, 9/127, 9/50, 31/70</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 95/21931 (43) Date de publication internationale: 17 août 1995 (17.08.95)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00098 (22) Date de dépôt international: 27 janvier 1995 (27.01.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/01381 8 février 1994 (08.02.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BAZILE, Didier [FR/FR]; 25, rue Albert-de-Mun, F-94100 Saint-Maur-des-Fosses (FR). EMILE, Carole [FR/FR]; 144, boulevard de Charonne, F-75020 Paris (FR). HELENE, Claude [FR/FR]; 14, quai d'Orléans, F-75004 Paris (FR). SPENLEHAUER, Gilles [FR/FR]; 10, place Ovale, F-94230 Cachan (FR). (74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>	
<p>(54) Title: NUCLEIC ACID-CONTAINING COMPOSITION, ITS PREPARATION AND USE (54) Titre: COMPOSITION CONTENANT DES ACIDES NUCLEIQUES, PREPARATION ET UTILISATIONS (57) Abstract Compositions including nucleic acids and cationic oligopeptides capable of forming secondary structures, and their use in therapeutics and gene therapy, in particular for transferring nucleic acids into cells, are disclosed. (57) Abrégé La présente invention concerne des compositions comprenant des acides nucléiques et des oligopeptides cationiques capables de former des structures secondaires, et leur utilisation en thérapeutique et en thérapie génique, notamment pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Gambie	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Bresil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

COMPOSITION CONTENANT DES ACIDES NUCLEIQUES
PREPARATION ET UTILISATIONS

La présente invention concerne des compositions à base d'acides nucléiques, leur préparation et leur utilisation. Plus particulièrement, elle concerne des compositions comprenant des acides nucléiques et des oligopeptides et leur utilisation en thérapie génique, notamment pour le transfert d'acides nucléiques.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anomalie (mutation, expression aberrante, etc) par introduction d'une information génétique dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique peut être introduite soit in vitro dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme, soit directement in vivo dans le tissu approprié. Différentes techniques ont été décrites pour le transfert de cette information génétique, parmi lesquelles des techniques diverses de transfection impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), d'ADN et de lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), l'emploi de liposomes (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc. Plus récemment, l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physiques de transfection. A cet égard, différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.

Toutefois, les techniques développées jusqu'à présent ne permettent pas de résoudre de manière satisfaisante les difficultés liées au transfert de gènes dans les cellules et/ou l'organisme. En particulier, les problèmes liés à la pénétration de l'acide nucléique dans les cellules ne sont pas entièrement résolus. En effet, la nature polyanionique des acides nucléiques prévient leur passage à travers les membranes cellulaires. Si l'a été montré que les acides nucléiques nus sont capables de traverser la membrane plasmique ex vivo (voir notamment la demande n° WO90/11092), l'efficacité de transfection reste assez faible. De plus, les acides nucléiques nus ont une demi-vie plasmatique courte, en raison de leur dégradation par les enzymes et de leur élimination par les voies urinaires. Par ailleurs, si les virus recombinants permettent d'améliorer l'efficacité de transfert des acides nucléiques, leur emploi présente certains

risques tels que la pathogénicité, la transmission, la réplication, la recombinaison, la transformation, etc.

La présente invention apporte une solution avantageuse à ces différents problèmes. La demanderesse a en effet montré qu'il est possible de former des paires d'ions entre des oligopeptides cationiques particuliers et les groupements phosphates des acides nucléiques, et que les complexes ainsi formés sont stables, et sont capables de pénétrer les cellules ou d'être encapsulés dans des vecteurs de transfert tels que des liposomes, des nanoparticules ou des lipoprotéines de faible densité (LDL) avec des rendements élevés.

Un premier objet de l'invention réside donc dans une composition comprenant un acide nucléique et un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires. Le terme structure secondaire désigne les peptides capables d'adopter une conformation spatiale particulière dans des conditions physiologiques, par opposition aux peptides ne présentant pas d'organisation particulière de leur structure primaire. La structure secondaire peut apparaître soit dans certains solvants, soit en solution aqueuse, soit après complexation avec l'acide nucléique.

Plus particulièrement, les oligopeptides utilisés dans le cadre de l'invention sont capables de former des hélices α ou des feuillets β .

La complexation d'un acide nucléique avec une polylysine a déjà été décrite dans l'art antérieur. Cependant, le taux de complexation et la stabilité du complexe formé avec la polylysine sont relativement faibles, et ces complexes ne peuvent être encapsulés dans des vecteurs de transfert de façon satisfaisante (voir exemples). Au contraire, les complexes selon l'invention, qui impliquent des oligopeptides cationiques capables de former des structures secondaires (hélices α , feuillets β) présentent une stabilité élevée, peuvent être obtenus avec des rendements proches de 100%, et sont capables d'être encapsulés avec des rendements élevés dans des vecteurs de transfert. Ces complexes constituent donc des outils particulièrement avantageux pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules. Par ailleurs, selon la nature du vecteur de transfert utilisé, les compositions de l'invention peuvent être utilisées sur des cellules extraites de l'organisme (ex vivo) en vue de leur réadministration, ou directement in vivo.

Plus particulièrement, les oligopeptides utilisés dans le cadre de la présente invention répondent à la formule $(A_O A_Y A_Y A_O)_n$ ou $(A_O A_Y A_O A_Y)_n$ dans laquelle A_O est un acide aminé hydrophobe, A_Y est un acide aminé hydrophile, et n est un nombre entier supérieur ou égal à 4. La demanderesse a en effet montré que de tels oligopeptides sont capables, une fois complexés aux acides nucléiques, de former des structures secondaires qui stabilisent fortement lesdits complexes.

Plus préférentiellement, l'acide aminé hydrophobe est choisi parmi la leucine, la valine, l'isoleucine et la phénylalanine; et l'acide aminé hydrophile est choisi parmi la lysine, l'arginine et l'histidine.

La capacité des oligopeptides à former des structures secondaires peut être vérifiée par dichroïsme circulaire ou en RMN, comme indiqué dans les exemples.

Encore plus préférentiellement, l'oligopeptide selon l'invention est choisi parmi les oligopeptides de formule $(LKKL)_n$, $(LKLK)_n$, $(LRRL)_n$, dans lesquelles n est défini comme précédemment.

D'une manière générale, dans les oligopeptides de l'invention, n peut varier entre 4 et 100, de préférence entre 10 et 50. La valeur de n est adaptée par l'homme du métier en fonction de la longueur et de la nature de l'acide nucléique, de la composition de l'oligopeptide, de l'utilisation recherchée, etc.

Pour obtenir un effet optimum des compositions de l'invention, les proportions respectives de l'oligopeptide et de l'acide nucléique sont de préférence déterminées de sorte que le rapport charges positives de l'oligopeptide / charges négatives de l'acide nucléique soit égal ou supérieur à 1 (ce rapport est désigné R dans les exemples). Ainsi, plus l'acide nucléique est long, plus le nombre de charges positives apporté par l'oligopeptide doit être élevé pour obtenir un effet maximum. Ceci peut se traduire soit par l'utilisation d'oligopeptides dans lesquels la valeur de n est plus élevée, soit par l'utilisation de quantités plus élevées d'oligopeptides, soit encore par les deux.

Les oligopeptides utilisés dans le cadre de la présente invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier. Préférentiellement, ils sont synthétisés par voie chimique, au moyen d'un synthétiseur de peptides, en utilisant tout type de chimie connue de l'homme du métier (F-moc, T-boc, etc). Lorsque les valeurs

de n sont élevées, il est par ailleurs possible de synthétiser les oligopeptides en plusieurs fragments qui sont ensuite assemblés. Par ailleurs, selon la technique de synthèse utilisée (par exemple en phase homogène), l'oligopeptide obtenu peut être non pas un composé défini, mais un mélange d'oligopeptides ayant des longueurs différentes centrées autour d'une moyenne. Dans ce cas, la valeur de n de la formule de l'invention représente la moyenne des valeurs des n des différents constituants du mélange. Des méthodes de synthèse appropriées sont données dans les techniques générales de biologie moléculaire et dans les exemples.

Au sens de la présente invention, le terme acide nucléique comprend aussi bien les acides désoxyribonucléiques que les acides ribonucléiques. Il peut s'agir de séquences d'origine naturelle ou artificielle, et notamment d'ADN génomique, d'ADNc, d'ARNm, d'ARNt, d'ARNr, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces acides nucléiques peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc. Ils peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. Ils peuvent par ailleurs être incorporés dans des vecteurs, tels que des vecteurs plasmidiques.

Concernant plus particulièrement les acides désoxyribonucléiques, ils peuvent être simple ou double brin. Ces acides désoxyribonucléiques peuvent porter des gènes thérapeutiques, des séquences régulatrices de la transcription, des séquences antisens, des régions de liaison à d'autres composants cellulaires, etc.

Au sens de l'invention, on entend par gène thérapeutique notamment tout gène codant pour une ou des protéines (ou peptide ou polypeptide) ayant une activité pharmacologique. Il peut s'agir d'enzymes, d'hormones, de facteurs de croissance, de lymphokines, d'apolipoprotéines, etc. Par séquence antisens, on entend toute séquence capable, directement ou indirectement (après transcription en ARN) de réduire les niveaux d'expression d'une protéine désirée, voire de les supprimer (EP 140 308). Les antisens comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321 201).

Concernant plus particulièrement les acides ribonucléiques (ARN), il peut s'agir d'ARN antisens, capables de bloquer au moins partiellement la traduction d'ARNm cibles (cellulaires, viraux, bactériens, etc); ou également de ribozymes ou

d'acides nucléiques capables de se lier à un autre acide nucléique par formation d'une triple hélice.

Les compositions selon l'invention peuvent être utilisés in vitro, ex vivo ou in vivo. In vitro, elles peuvent permettre de transférer à des lignées cellulaires des séquences d'acides nucléiques désirées, par exemple dans le but d'exprimer une protéine recombinante ou une activité antisens, ou dans le but d'inhiber une protéine, par fixation de ladite protéine sur l'acide nucléique. Ex vivo, elles peuvent être utilisés pour le transfert thérapeutique d'un acide nucléique dans une cellule issue d'un organisme, en vue de conférer à ladite cellule des propriétés nouvelles ou renforcées, avant sa réadministration à un organisme. In vivo, elles peuvent être utilisés pour l'administration directe d'acide nucléique.

Un autre objet de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules. Comme indiqué plus haut, ce transfert peut être effectué in vitro, ex vivo ou in vivo.

Les compositions selon l'invention peuvent permettre de transférer des acides nucléiques dans des types variés de cellules. Préférentiellement, il s'agit de cellules animales, de préférence humaine. Il peut s'agir notamment de cellules hématopoïétiques, endothéliales, myoblastiques, etc. Par ailleurs, il peut s'agir aussi bien de cellules saines que de cellules affectées par des dysfonctionnements (tumeur, infection virale, etc).

L'invention concerne également un procédé pour le transfert d'un acide nucléique dans une cellule caractérisé en ce que l'on cultive ladite cellule en présence de l'acide nucléique et d'un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires.

Par ailleurs, les complexes acide nucléique-oligopeptide de la présente invention permettent également l'encapsulation des acides nucléiques dans des vecteurs de transfert avec des rendements considérablement améliorés. Pour diminuer les problèmes de stabilité et de pénétration dans les cellules, les acides nucléiques peuvent en effet être associés à des transporteurs ou à des vecteurs de médicament appropriés. L'encapsulation des acides nucléiques dans de tels vecteurs de transfert permet de les protéger des nucléases sériques, de faciliter leur pénétration dans les cellules où se trouve leur cible pharmacologique, et de ralentir leur élimination. Toutefois, la

difficulté majeure limitant l'utilisation de ces vecteurs réside dans les faibles rendements d'encapsulation des acides nucléiques. La demanderesse a maintenant montré que les complexes acide nucléique-oligopeptides de l'invention peuvent être encapsulés dans des vecteurs de transfert avec des rendements élevés. Plus
5 particulièrement, les rendements d'encapsulation des complexes de l'invention dans des nanoparticules sont supérieurs à 50%, alors qu'ils sont inférieurs à 1% avec des acides nucléiques nus, ou avec d'autres oligopeptides ne formant pas de structure secondaires (Cf exemples).

Un autre objet de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un oligopeptide
10 cationique capable de former des structures secondaires pour l'encapsulation d'acides nucléiques dans un vecteur de transfert.

L'invention a également pour objet les vecteurs de transfert d'acides nucléique comprenant une composition telle que définie ci-avant.

Parmi les différents vecteurs de transfert, on préfère utiliser dans le cadre de
15 la présente invention des vecteurs biocompatibles, biodégradables, hydrophobes et de nature protéique ou polymérique. En particulier, les vecteurs préférés selon l'invention sont les liposomes, les nanoparticules ou les lipoprotéines de faible densité (LDL).

Les liposomes sont des vésicules phospholipidiques comportant une phase aqueuse interne dans laquelle les acides nucléiques peuvent être encapsulés. La
20 synthèse de liposomes et leur utilisation pour le transfert d'acides nucléiques est connue dans l'art antérieur (WO91/06309, WO92/19752, WO92/19730). L'utilisation de complexes selon l'invention permet d'améliorer l'efficacité d'encapsulation des acides nucléiques dans les liposomes.

Les nanoparticules sont des particules de petite dimension, généralement
25 inférieure à 500 nm, capables de transporter ou de vectoriser un principe actif (tel qu'un acide nucléique) dans les cellules ou dans la circulation sanguine. La présente invention permet également d'améliorer considérablement les rendements d'encapsulation d'acides nucléiques dans des nanoparticules. Préférentiellement, les nanoparticules selon l'invention sont constituées par des polymères comportant une
30 majorité de motifs dégradables tels que l'acide polylactique, éventuellement copolymérisé à du polyéthylène glycol. D'autres polymères utilisables dans la

réalisation de nanoparticules ont été décrits dans l'art antérieur (voir par exemple EP 275 796; EP 520 889).

L'invention concerne donc également un procédé d'encapsulation d'acides nucléiques dans des vecteurs de transfert selon lequel on met en contact le vecteur de transfert ou les composants le constituant, l'acide nucléique et un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires, ou éventuellement un complexe acide nucléique - oligopeptide déjà formé, dans des conditions permettant l'encapsulation de l'acide nucléique dans ledit vecteur de transfert, puis on récupère le vecteur de transfert formé. Comme indiqué plus haut, le procédé selon l'invention est préférentiellement appliqué pour la préparation de liposomes, de nanoparticules ou de lipoprotéines de faible densité.

L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant un acide nucléique thérapeutique et un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires, éventuellement encapsulés dans un vecteur de transfert.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Exemple 1 : Préparation des oligopeptides

Les trois oligopeptides suivants ont été synthétisés :

20 1.1. -(H)-(Leucine-Lysine-Lysine-Leucine)₁₀-(OH) ou (LKKL)₁₀.

Cet oligopeptide a été synthétisé sous forme de sel d'acide trifluoroacétique au moyen d'un synthétiseur de peptides Applied Biosystem 431A, sur une résine HMP (Applied Biosystem) et selon une stratégie F-MOC. Après la synthèse, le peptide a été libéré de la résine par traitement 90 minutes en présence d'une solution TFA/eau 95/5 (v/v), précipité par addition d'ether tertiobutylméthylique, puis purifié par HPLC phase inverse sur colonne C18 100 A (Biorad RSL). La pureté du peptide obtenu est supérieure à 95 % et sa solubilité dans l'eau de 50 mg/ml. Il a été montré que le polytétrapeptide LKKL, non structuré dans l'eau, adopte une conformation en hélice α en solution saline. Cette conformation devrait améliorer la stabilité du complexe par formation de paires d'ions entre les charges positives des lysines de l'oligopeptide et les phosphates ionisés à pH physiologique de l'acide nucléique.

1.2. -(H)-(Leucine-Lysine-Leucine-Lysine)₁₀-(OH) ou (LKLK)₁₀.

- Cet oligopeptide a été synthétisé sous forme de sel d'acide trifluoroacétique en suivant le protocole décrit ci-dessus. La pureté du peptide obtenu est supérieure à 90% et sa solubilité dans l'eau de 100 mg/ml. Il a été montré que le polytétrapeptide LKLK, non structuré dans l'eau, adopte une conformation en feuillets β en solution saline ou en présence d'acides nucléiques, en raison de l'interaction entre phosphates et groupements aminés. Le long d'un feuillet β , la distance séparant 2 charges positives est de 6,9 Å, ce qui est compatible avec les 6,2 Å séparant 2 groupements phosphate d'un acide nucléique simple brin. Cette conformation devrait donc améliorer la stabilité du complexe.

1.3. -(H)-(Proline-Lysine-Lysine-Leucine)₁₀-(OH) ou (PKKL)₁₀.

Ce peptide (fourni par A. Brack, Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans) n'est pas structuré en solution saline et a été utilisé comme contrôle.

1.4. Polylysine.

- La polylysine utilisée est d'origine commerciale. Ce peptide n'est pas structuré en solution saline et a été utilisé comme contrôle.

Exemple 2 : Acides nucléiques utilisés2.1. Acides nucléiques antisens anti-ras Val12

- Des acides nucléiques antisens anti ras ont été préparés. Ces acides nucléiques sont des oligonucléotides de 12 et 13 résidus, synthétisés par la société Eurogentec (Belgique). Ces oligonucléotides sont dirigés contre une séquence de l'ARNm de ras muté au niveau du douzième codon. Les acides nucléiques utilisés sont l'antisens (AS-Val), son inverse (INV-Val : la séquence est identique mais orientée dans le sens inverse), ainsi que l'antisens de l'ARNm ras normal (AS-Gly) et qu'un acide nucléique témoin comportant 2 nucléotides non appariés au milieu de la séquence (AS-mut2). La séquences de ces acides nucléiques est la suivante :

3'-CGCGGCAGCCAC-5'	(AS-Val12)
3'-GCGGCAGCCACAC-5'	(AS-Val13)
3'-CACCGACGGCGC-5'	(INV-Val12)

3'-CACACCGACGGCG-5' (INV-Val113)
3'-CGCGGCCGCCAC-5' (AS-Gly12)
3'-CGCGGGAGCCAC-5' AS-mut212)

2.2. Acide nucléique (d(Tp)15T)

- 5 L'acide nucléique (d(Tp)15T) est composé de 16 thymidines. Il est d'origine commerciale (Pharmacia).

Exemple 3 : Etude de complexation

- Cet exemple illustre la formation de complexes entre les acides nucléiques antisens décrits dans l'exemple 2 et les oligopeptides décrits dans l'exemple 1, dans différentes conditions de force ionique et de concentration (toutes les concentrations en acides nucléiques sont exprimées en phosphate). Il montre que des rendements de complexation très élevés peuvent être obtenus, témoignant ainsi de la stabilité des complexes.

3.1. Complexation en tampon phosphate

- 15 L'acide nucléique (10^{-4} M exprimé en phosphate : $C_{\text{phosphate}} = 12 \times C_{\text{acide nucléique}}$) et l'oligopeptide (concentration variant entre $2 \cdot 10^{-3}$, 10^{-4} et $2 \cdot 10^{-5}$ exprimées en charges positives) ont été mis en contact dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,4. La solution a ensuite été centrifugée, et l'absorbance (A) à 256 nm (maximum d'absorption des acides nucléiques) déterminée dans le surnageant. Pour
- 20 chaque valeur du rapport R (Nombre de charges positives de l'oligopeptide / Nombre de charges négatives de l'acide nucléique) testée, la valeur A/A_0 est déterminée, permettant d'évaluer la fraction d'acide nucléique libre et, par différence, la fraction complexée. Pour un rapport $R = 1$, la concentration en oligopeptide exprimée en lysine est donc de 10^{-4} M.
- 25 Les résultats obtenus montrent que la fraction de complexe précipitant AS-Val13/LKKL₁₀ ou INV-Val13/LKKL₁₀ est de 85 % pour un rapport $R = 2$. Pour un rapport $R = 1$, la fraction de complexe précipitant AS-Val13/LKKL₁₀ et INV-Val13/LKKL₁₀ est inférieure : 30 %. Ces résultats peuvent s'expliquer par une
- 30 compétition entre les phosphates du tampon et les phosphates de l'acide nucléique pour la formation du complexe. Ces résultats sont cependant supérieurs à ceux

obtenus avec l'oligopeptide controle : 15 % de complexe INV-Val13/PKKL10 précipitant seulement.

3.2. Complexation en tampon Tris-HCl

5 L'acide nucléique (10^{-4} M) et l'oligopeptide (concentration variable) ont été mis en contact dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,4. La solution a ensuite été centrifugée, et l'absorbance à 256 nm déterminée dans le surnageant. Pour chaque valeur du rapport R testée, la valeur A/A0 est déterminée comme précédemment.

10 Les résultats obtenus montrent que la fraction de complexe précipitant AS-Val13/LKKL10 et AS-Val13/LKLK10 est de 100 % pour un rapport R = 1. Pour un rapport R = 2, la fraction de complexe précipitant AS-Val13/LKLK10 est également de 100 %. Par ailleurs, 100 % de complexe précipitant AS-Val13/LKKL10 ont également été obtenus avec une concentration d'acide nucléique de $2 \cdot 10^{-5}$ M et un rapport R = 1.

15 En revanche, en ce qui concerne le complexe AS-Val13/PKKL10, seulement 70 % des acides nucléiques impliqués dans le complexe précipite ce qui démontre que l'affinité des oligopeptides selon l'invention est supérieure.

3.3. Complexation dans l'eau

20 Le protocole ci-dessus a été répété en remplaçant le tampon Tris-HCl par de l'eau. Les mêmes résultats ont été obtenus (100 % de complexation pour R = 1), démontrant l'affinité élevée des oligopeptides de l'invention pour les acides nucléiques.

3.4. Conclusions

25 L'ensemble de ces résultats démontre le rendement élevé de complexation des oligopeptides de l'invention aux acides nucléiques, et le fait que ce rendement est indépendant de la séquence et de la concentration de l'acide nucléique utilisé. Par ailleurs, comme le montre le tableau ci-après, l'étude des spectres dichroïques a permis de confirmer les structures secondaires adoptées par les oligopeptides cationiques utilisés, en solution ou après complexation.

Peptide	Tampon Phosphate 50mM	Tampon Phosphate 50mM / NaCl 0,2M	Eau	Eau / acide nucléique
LKKL	hélice α	hélice α	non structuré	hélice α
LKLL	feuillet β	feuillet β	non structuré	feuillet β
PKKL	non structuré	non structuré	non structuré	non structuré

Exemple 4 : Etude de l'encapsulation dans un vecteur de transfert : les nanoparticules.

Cet exemple illustre les propriétés très avantageuses des complexes de l'invention, permettant l'encapsulation d'acide nucléique dans des vecteurs de transfert avec des rendements très élevés.

4.1. Nanoparticules utilisées : Les nanoparticules utilisées dans cet exemple sont des copolymères dibloc constituées d'un poly (D,L acide lactique) lié par une liaison ester à un poly (éthylène glycol) : PLAp(M)-PEG(N) où M et N sont respectivement les masses moléculaires moyennes (en kD) du PLA et du PEG, et p, le pourcentage d'acide L-lactique. Les 2 types de nanoparticules utilisés sont du PLA50(30)-PEG(2) et du PLA50(30)-PEG(5). Ces copolymères peuvent être synthétisés par toute technique connue de l'homme du métier (voir par exemple EP 520 889).

4.2. Marquage radioactif des acides nucléiques :

Les acides nucléiques ont été traités avec de la polynucléotide kinase du phage T4 (Biolabs) en présence d'ATP- $\gamma^{32}\text{P}$ (Amersham) dans un tampon kinase. Après 30 min d'incubation à 37°C, l'acide nucléique a été séparé de l'ATP n'ayant pas réagi par dépôt sur colonne Séphadex G25 (Quick Spin) et centrifugation.

4.3. Encapsulation de l'acide nucléique INV-Val13

Cet exemple décrit l'encapsulation de l'acide nucléique INV-Val13 dans une nanoparticule de PLA50(30)-PEG(2) en présence ou en l'absence d'oligopeptide (LKKL)₁₀.

Le polymère utilisé (PLA50(30)-PEG(2)) a été solubilisé dans 1 ml d'acétone à une concentration de 10 g/l. La dilution isotopique de l'acide nucléique (concentration finale 10^{-5} M) a été ajoutée, puis l'oligopeptide (à une concentration telle que $R = 1$). La solution organique obtenue a ensuite été versée goutte à goutte dans 5 ml d'une solution aqueuse (tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4), sous agitation. Le polymère insoluble dans le mélange eau/acétone précipite sous forme de nanoparticules, emprisonnant le complexe acide nucléique-oligopeptide. L'acétone a ensuite été éliminée par évaporation sous vide partiel, jusqu'à un volume final de 2,5 ml. Enfin, la suspension nanoparticulaire a été filtrée à travers un filtre Sartorius de porosité 1,2 μ m, qui tient lieu de crible de dispersion et d'injectabilité.

Une expérience contrôle a été effectuée dans les mêmes conditions, mais en l'absence de l'oligopeptide (LKKL)₁₀.

Les résultats obtenus montrent que le rendement d'encapsulation de INV-Va113 dans la nanoparticule est de 56 % en présence de l'oligopeptide, et de 5 % seulement sans l'oligopeptide.

Le rendement d'encapsulation correspond au pourcentage d'acide nucléique encapsulé dans les nanoparticules, par rapport à la quantité totale d'acide nucléique présente au départ.

4.4. Encapsulation de l'acide nucléique (d(Tp)15T)

Le rendement d'encapsulation de l'acide nucléique (d(Tp)15T) (exemple 2.2.) dans une nanoparticule de PLA50 a été étudié, en présence des oligopeptides cationiques suivants :

- LKKLn Hélice α : synthétisé en phase homogène sous forme d'un mélange de peptides de poids moléculaire moyen de 34900.
- 25 - LKLKn Feuillet β : synthétisé en phase homogène sous forme d'un mélange de peptides de poids moléculaire moyen de 7400.
- PKKLn Pas de structure secondaire
- Kn Pas de structure secondaire

ou de sphingosine (lipide membranaire chargé positivement).

- Pour cela, l'acide nucléique (d(Tp)15T) a été mélangé à l'oligopeptide en solution dans l'eau. En ce qui concerne la sphingosine, elle est solubilisée dans un mélange eau/éthanol 50 % v/v. Les concentrations utilisées sont indiquées dans le tableau qui suit.
- 100 µl d'une solution d'acide polylactique (PLA₅₀) solubilisée dans l'acétone à une concentration de 20 g/l ont été ajoutés au mélange, ainsi que 300 µl d'acétone pure (concentration finale en PLA₅₀ : 5 g/l). Après homogénéisation au vortex, le mélange a été versé goutte à goutte dans une solution aqueuse de pluronic F68 à 2,5 % (p/v) afin de précipiter le polymère sous forme d'une suspension colloïdale nanoparticulaire turbide. La turbidité a été appréciée à l'oeil. Le diamètre des nanoparticules (175 +/- 40 nm) a été mesuré par diffusion quasi élastique de la lumière sur un appareil BI 90 (Brookhaven Instrument Corporation). L'acétone a ensuite été évaporée sous vide pendant une heure. La suspension a ensuite été filtrée sur filtre millipore AP20 (diamètre des pores : 1,5 µm), préalablement mouillé avec la solution de pluronic F68 à 2,5 %.
- 15 Le rendement d'encapsulation a été déterminé et est reporté dans le tableau qui suit.

Peptide	LKKLn	LKLKn	PKKLn	Kn	Sphingo.
Structure	Hélice α	Feuillet β	aucune	aucune	aucune
Concentration du peptide (mM)	5	12,5	9,2	1	2,2
Volume de peptide dans le mélange (µl)	11,4	65	48	60	27
Quantité de peptide (nmol)	57	812	442	60	60
Concentration de d(Tp)15T	71 µM				
Volume de d(Tp)15T	28 µl				
Quantité de d(Tp)15T	2 nmol				
R	2	27	14,7	2	2
Rendement	42,8	7,8	0,8	0,3	1,3

- Ces résultats montrent clairement que les oligopeptides de l'invention permettent d'encapsuler les acides nucléiques avec des rendements nettement supérieurs à ceux obtenus avec des oligopeptides de l'art antérieur (polylysine) ou ne formant pas de structures secondaires (PKKL).
- 20

Exemple 5 : Transfert d'acide nucléique dans les cellules

Cet exemple illustre la capacité des composition de l'invention à transférer des acides nucléiques dans les cellules.

- 5 5.1. Cellules utilisées : Les essais de transfert d'acide nucléique décrits dans cet exemple ont été effectués sur une lignée de cellules issue d'un carcinome vésical humain, désignée T24/EJ accessible à l'ATCC. Les cellules ont été cultivées dans un milieu MEM-EAGLE ("minimum essential medium", Biological Industries) supplémenté en L-glutamine ((5 mM), streptomycine (50 u/ml), pénicilline (50 u/ml), en présence de 7 % de sérum de veau foetal décomplémenté 30 min à 60°C.
- 10 5.2. Transfert des acides nucléiques : Les cellules (1500 / puits) ont étéensemencées dans des microplaques de 96 puits, en absence ou en présence d'acide nucléique, encapsulé ou non dans des nanoparticules, dans un volume total de 100 µl. Chaque point a été effectué en triple. La concentration en acide nucléique utilisée a été ajustée par dilution dans de l'eau ou par concentration par centrifugation 1 h à 12000 rpm.
- 15 Dans ce cas, la suspension est centrifugée, le culot pesé puis le volume ajusté.

L'efficacité du transfert a été déterminée par mesure de l'inhibition de la prolifération cellulaire induite par l'acide nucléique antisens, après 72 ou 96 heures de culture à 37°C en présence de 5 % de CO₂. Pour cela, 2 méthodes ont été utilisées :

- 20 - Tout d'abord, l'incorporation de thymidine tritiée, qui a été déterminée après addition de 2 µCi de 3H thymidine par puits. Après 6 heures d'incubation à l'étuve, les plaques ont été lavées au Skatron (Lier, Norvège), l'ADN recueilli sur un filtre, et chaque rondelle du filtre (correspondant à chaque puits de la plaque) placée dans du liquide à scintillation puis comptée au compteur (LKB Wallac 1211 Minibeta). Les résultats correspondent à la moyenne des valeurs obtenues dans chacun des 3 puits.
- 25 - Ensuite, la prolifération cellulaire a été évaluée par comptage des cellules en cellule de Malassez. Pour cela, le surnageant a été éliminé, les cellules trypsinisées (10 min à 37°C), puis additionnées de milieu de culture avant d'être comptées.

Les résultats obtenus sont les suivants :

- 30 - AS-Val12, nu, 30 µM42 % d'inhibition
 - AS-Val12/LKKL/nanoparticule, 100 nM (exprimé en antisens) .50 % d'inhibition
 - nanoparticule blanche, même quantité de polymère.....< 5 % d'inhibition

- AS-Val12/LKKL/nanoparticule, 500 nM.....95 % d'inhibition

Ces résultats démontrent clairement l'efficacité des compositions de l'invention pour le transfert d'acides nucléiques. De plus, ils montrent que l'acide nucléique transféré conserve ses propriétés fonctionnelles, dans le cas présent, son activité d'antisens.

REVENDICATIONS

1. Composition comprenant un acide nucléique et un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires.
2. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'oligopeptide
5 est capable de former des hélices α ou des feuillets β .
3. Composition selon la revendication 2 caractérisée en ce que l'oligopeptide répond à la formule $(A_O A_Y A_Y A_O)_n$ ou $(A_O A_Y A_O A_Y)_n$ dans laquelle A_O est un acide aminé hydrophobe, A_Y est un acide aminé hydrophile, et n est un nombre entier supérieur ou égal à 4.
- 10 4. Composition selon la revendication 3 caractérisée en ce que l'acide aminé hydrophobe est choisi parmi la leucine, la valine, l'isoleucine et la phénylalanine.
5. Composition selon la revendication 3 caractérisée en ce que l'acide aminé hydrophile est choisi parmi la lysine, l'arginine et l'histidine.
6. Composition selon la revendication 3 caractérisée en ce que l'oligopeptide
15 est choisi parmi $(LKKL)_n$, $(LKLK)_n$, $(LRRL)_n$.
7. Composition selon la revendication 6 caractérisée en ce que n est compris entre 4 et 100, de préférence entre 10 et 50.
8. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide désoxyribonucléique.
- 20 9. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide ribonucléique.
10. Composition selon la revendication 8 ou 9 caractérisée en ce que l'acide nucléique est modifié chimiquement.
11. Composition selon la revendication 8 ou 9 caractérisée en ce que l'acide
25 nucléique est un antisens.
12. Composition selon la revendication 8 caractérisée en ce que l'acide nucléique comporte un gène thérapeutique.

13. Composition selon l'une des revendications 8 à 12 caractérisée en ce que le rapport charges positives de l'oligopeptide / charges négatives de l'acide nucléique est égal ou supérieur à 1.

14. Vecteur de transfert d'acides nucléique comprenant une composition selon
5 l'une des revendications précédentes.

15. Vecteur de transfert selon la revendication 14 caractérisé en ce qu'il s'agit d'une nanoparticule, d'un liposome ou d'une lipoprotéine de faible densité.

16. Procédé d'encapsulation d'acides nucléiques dans des vecteurs de transfert caractérisé en ce que l'on met en contact le vecteur de transfert ou ces composants,
10 l'acide nucléique et un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires, ou éventuellement un complexe acide nucléique-oligopeptide déjà formé, dans des conditions permettant l'encapsulation de l'acide nucléique dans ledit vecteur de transfert, puis on récupère le vecteur de transfert formé.

17. Procédé pour le transfert d'un acide nucléique dans une cellule caractérisé
15 en ce que l'on cultive ladite cellule en présence de l'acide nucléique et d'un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires.

18. Utilisation d'un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules.

19. Utilisation selon la revendication 18 pour le transfert in vitro, ex vivo ou
20 in vivo.

20. Composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique thérapeutique et un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires, éventuellement encapsulés dans un vecteur de transfert.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/00098

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/87 C12N15/11 C07K14/00 A61K48/00 A61K9/127
A61K9/50 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A. (1993), 90(3), 893-7, LEGENBRE, J.-Y. ET AL. 'Cyclic amphipathic peptide-DNA complexes mediate high-efficiency transfection of adherent mammalian cells' see the whole document	1,2,8, 13-20 3-5,7-12
Y	WO,A,93 07892 (THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA) 29 April 1993 see page 8, line 10 - page 10 * SEQ IDs 91-96 *	3-5,7
Y	WO,A,92 22651 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 23 December 1992 see the whole document	8-11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 May 1995

Date of mailing of the international search report

20.06.95

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentamt 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Telex 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/00098

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,91 17773 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 28 November 1991	12
A	see page 11, line 1 - line 16 see page 16, paragraph C ---	1-20
X	TETRAHEDRON, vol. 47, OXFORD GB, page 4113 ERITJA, R. ET AL. 'Synthesis of defined peptide-oligonucleotide hybrids containing a nuclear transport signal sequence' see the whole document ---	1,8,11
X	EP,A,0 424 688 (STADLER, J. & ANTONELLI, N.) 2 May 1991 see the whole document ---	1,8, 14-19
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 88, WASHINGTON US, page 4255 WAGNER, E. ET AL. 'Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells' see the whole document -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR95/00098

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 19 and 18 (in so far as they pertain to in vivo procedures) concern a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out, based on the alleged effects of the product (compound).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/00098

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9307892	29-04-93	AU-A- 2901692 CA-A- 2120337 JP-T- 7500342	21-05-93 17-04-93 12-01-95
WO-A-9222651	23-12-92	AU-A- 2249792 CA-A- 2111472 EP-A- 0590082 JP-T- 6504679 WO-A- 9408003	12-01-93 23-12-92 06-04-94 02-06-94 14-04-94
WO-A-9117773	28-11-91	DE-A- 4110410 EP-A- 0532525	01-10-92 24-03-93
EP-A-0424688	02-05-91	US-A- 5286634	15-02-94

Demo Internationale No
PCT/FR 95/00098

Formulaire PCT/SLA/219 (description finale) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 95/00098

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO,A,91 17773 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 28 Novembre 1991	12
A	voir page 11, ligne 1 - ligne 16 voir page 16, alinéa C ---	1-20
X	TETRAHEDRON, vol. 47, OXFORD GB, page 4113 ERITJA, R. ET AL. 'Synthesis of defined peptide-oligonucleotide hybrids containing a nuclear transport signal sequence' voir le document en entier ---	1,8,11
X	EP,A,0 424 688 (STADLER, J. & ANTONELLI, N.) 2 Mai 1991 voir le document en entier ---	1,8, 14-19
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 88, WASHINGTON US, page 4255 WAGNER, E. ET AL. 'Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells' voir le document en entier -----	1-13

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR95/00098

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n° se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Remarque: Bien que les revendications 19 et 18 (pour autant qu'elles aient pour objet des procédés in vivo) concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit (à la composition).
2. ☐ Les revendications n° se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n° sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 95/00098

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9307892	29-04-93	AU-A- 2901692	21-05-93
		CA-A- 2120337	17-04-93
		JP-T- 7500342	12-01-95
WO-A-9222651	23-12-92	AU-A- 2249792	12-01-93
		CA-A- 2111472	23-12-92
		EP-A- 0590082	06-04-94
		JP-T- 6504679	02-06-94
		WO-A- 9408003	14-04-94
WO-A-9117773	28-11-91	DE-A- 4110410	01-10-92
		EP-A- 0532525	24-03-93
EP-A-0424688	02-05-91	US-A- 5286634	15-02-94